

**Perbanyakan *In Vitro* Dendrobium Indonesia Raya 'Ina'  
melalui Embriogenesis Somatik Berbasis Sistem Bioreaktor**

***In Vitro* Propagation of Dendrobium Indonesia Raya 'Ina'  
via Somatic Embryogenesis Based on Bioreactor System**

Fitri Rachmawati<sup>1\*</sup>, Budi Winarto<sup>1</sup>, Ni Made Armini Wiendi<sup>2</sup>, Nurhajati Ansori Mattjik<sup>2</sup>, dan Agus Purwito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Penelitian Tanaman Hias-Segunung (Indonesian Ornamental Crop Research Institute)  
Jl. Raya Ciherang Segunung, Pacet Cianjur 43253, PO Box 8 Sindanglaya, Indonesia  
<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor  
(Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 23 Oktober 2015/Disetujui 11 April 2016

**ABSTRACT**

*An effective and efficient in vitro propagation system has important roles in preparing and producing high quality-seedlings of Dendrobium for commercial scale. The objective of this research was to establish an effective and efficient embryogenic callus (EC) proliferation method using bioreactor system and regeneration EC into plantlet for producing high quality seedlings of Dendrobium Indonesia Raya 'Ina'. Differences in callus densities (5, 10, 15, and 20 g callus in 250 mL medium), aeration levels (2.5, 5.0, and 10.0 O<sub>2</sub> volume per medium volume per minute; vvm), and regeneration media half-strength MS and 2 g L<sup>-1</sup> NPK (32:10:10) combined by 0.00, 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA, 150 mL L<sup>-1</sup> coconut water and their combinations were tested in this experiment. The experiments were arranged using randomized completely block design (RCBD) with three replications for EC proliferation and randomized completely design (RBD) for EC regeneration. The results showed that combination of aeration at 2.5 vvm and 10 g of EC was the most suitable aeration level and callus density for proliferation of EC in the 500 ml airlift bioreactor with 6.85 multiplication rate, 92.5% EC formation, and malformed callus morphology as low as 6.1%. The highest somatic embryos (SEs) formation was 87.7% with 44.5 SEs per clump and 92.1% SEs germination with 41.0 germinated-SEs per clump, 85.1% normal germinated-SEs, and whereas the best performance of plantlet was obtained from 1/2 MS + 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA semi solid medium. Plantlets were successfully acclimatized using *Cycas rumphii* medium with high survival rate (91.6%).*

*Keywords: aerations, callus densities, germination, media, somatic embryos*

**ABSTRAK**

*Sistem perbanyakan in vitro yang efektif dan efisien memiliki peranan penting dalam mempersiapkan dan memproduksi benih Dendrobium bermutu untuk skala komersial. Penelitian bertujuan mendapatkan metode proliferasi kalus embriogenik (KE) menggunakan bioreaktor dan regenerasi KE menjadi plantlet yang efektif dan efisien untuk perbanyakan masal benih D. Indonesia Raya 'Ina' bermutu. Perbedaan kepadatan kalus (5, 10, 15, dan 20 g kalus dalam 250 mL media), tingkat aerasi (2.5, 5.0, dan 10.0 volume O<sub>2</sub> per volume media per menit; vvm), dan media regenerasi (media dasar 1/2 MS dan 2 g L<sup>-1</sup> NPK (32:10:10) yang dikombinasikan 0.00, 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA, 150 mL L<sup>-1</sup> air kelapa, dan kombinasi keduanya) diuji dalam penelitian ini. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) pola faktorial dengan tiga ulangan untuk proliferasi KE dan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga ulangan untuk regenerasi KE menjadi plantlet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi tingkat aerasi 2.5 vvm dengan kepadatan kalus 10 g paling sesuai untuk proliferasi KE dalam airlift bioreaktor 500 ml dengan 6.85 tingkat multiplikasi, 92.5% pembentukan KE, dan 6.1% malformasi morfologi kalus. Diferensiasi dan perkecambahan embrio somatik (ES) tertinggi (87.7%) dengan 44.5 ES per gerombol, 92.1% ES berkecambah dengan 41.0 kecambah per gerombol, 85.1% kecambah normal, dan menghasilkan pertumbuhan plantlet terbaik ditemukan pada media semi-solid 1/2 MS + 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA. Plantlet berhasil diaklimatisasi pada media akar pakis dengan keberhasilan hidup yang tinggi (91.6%).*

*Kata kunci: aerasi, embrio somatik, kepadatan kalus, media, perkecambahan*

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail: [fitri\\_a2005@yahoo.com](mailto:fitri_a2005@yahoo.com)

## PENDAHULUAN

*Dendrobium* merupakan komoditas anggrek yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan banyak diminati pasar karena keunggulan yang dimilikinya (Kuehnle, 2007; Widiastoety *et al.*, 2010). Indonesia memiliki cukup banyak *Dendrobium* hibrida unggul yang berpotensi untuk dikembangkan dan siap bersaing dipasaran dengan *Dendrobium* hibrida impor, salah satunya adalah *Dendrobium* Indonesia Raya 'Ina' (*D. Kim Bora* x *D. Wee Lian*) yang berpotensi sebagai bunga pot. Kultivar ini memiliki keunggulan, yaitu: umur berbunga genjah (2.5 tahun sejak aklimatisasi); mengeluarkan 4 tangkai bunga dengan posisi tegak dan bunga spiral; panjang tangkai bunga 41-50 cm dengan 18-29 bunga per tangkai; kesegaran bunga lebih dari 2.5 bulan; tinggi tanaman mencapai 80 cm; tahan penyakit; dan cocok dibudidayakan di dataran rendah sampai menengah (PPVT, 2009). Pengembangan kultivar ini pada skala komersial masih terkendala oleh ketersediaan benihnya yang masih sangat terbatas.

Perbanyakan *Dendrobium* melalui embriogenesis somatik menggunakan genotipe, eksplan, media, sistem kultur, kondisi inkubasi, dan kepadatan kalus yang berbeda telah dilaporkan, seperti pada *D. 'Chiengmai Pink'* (Chung *et al.*, 2007); *D. 'Serdang Beauty'* (Khasrovi *et al.*, 2008); *D. candidum* (Zhao *et al.*, 2008); *D. 'Gradita 31'* (Winarto dan Rachmawati, 2013); *D. 'Zahra FR 62'* (Winarto *et al.*, 2013); dan *D. 'Gradita 10'* (Rachmawati *et al.*, 2014). Teknologi tersebut masih memiliki keterbatasan, diantaranya proliferasi kalus umumnya masih dilakukan secara konvensional/manual menggunakan sistem kultur cair dalam erlenmeyer 100 mL dengan kapasitas terbatas dan intensitas subkultur yang tinggi, sehingga tidak bisa diandalkan untuk penyediaan benihnya skala komersial dan berkesinambungan.

Sistem kultur cair menggunakan bioreaktor terbukti efektif dan efisien dalam peningkatan skala dan otomatisasi perbanyakan benih berbagai tanaman, seperti pada: *Coffea canephora* (Etienne *et al.*, 2006; Ducos *et al.*, 2007); *Fragaria ananassa* Duch (Debnath, 2009); *Spathiphyllum cannifolium* (Dewir *et al.*, 2006); *Musa spp* (Aragón *et al.*, 2010); *Lessertia frutescens* (Shaik *et al.*, 2010); *Gentiana triflora* (Dewir *et al.*, 2010), dan *Citrus reticula* Hort. Ex. Tanaxa (Agisimanto *et al.*, 2012). Sistem bioreaktor pada anggrek telah diaplikasikan pada *Phalaenopsis* (Young *et al.*, 2000), *Oncidium* 'Sugar Sweet' (Yang *et al.*, 2010), dan *D. Zahra 'FR-62'* (Winarto *et al.*, 2013). Alat ini dapat meningkatkan kecepatan proliferasi sel karena penyerapan nutrisi yang optimal, ketersediaan oksigen yang cukup, dan pergerakan eksplan yang aktif (Takayama dan Akita, 2005). Meski keberhasilan pemanfaatan alat ini dipengaruhi oleh banyak faktor seperti tingkat aerasi, kepadatan kultur, komposisi media, kondisi fisik kultur (pH, cahaya, suhu, dll), fase pertumbuhan sel/umur sel, jenis kalus, dan genotype (Ziv, 2005; Celiktas *et al.*, 2010), pengembangan sistem proliferasi menggunakan bioreaktor diduga dapat menjadi teknologi terobosan penting untuk mengatasi masalah keterbatasan benih bermutu dan menunjang

agribisnis anggrek *Dendrobium* skala komersial. Meskipun Winarto *et al.* (2013) sudah melakukannya pada *D. 'Zahra FR 62'*, namun pengaplikasiannya pada *D. Indonesia Raya 'Ina'* belum dilakukan, sehingga perlu dioptimasi dan dikaji lebih lanjut.

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode perbanyakan *in vitro* yang efektif dan efisien untuk perbanyakan masal benih *D. Indonesia Raya 'Ina'* bermutu. Tujuan penelitian secara khusus adalah: (1) mendapatkan metode proliferasi kalus embriogenik (KE) menggunakan *airlift bioreactor* teroptimasi dengan mempelajari faktor tingkat aerasi dan kepadatan kalus, (2) mendapatkan media regenerasi terbaik untuk diferensiasi KE dan perkecambahan embrio somatik (ES), dan (3) melihat pengaruh media perkecambahan terhadap kemampuan produksi plantlet.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung Pacet Cianjur, bulan Maret sampai dengan Desember 2014.

Eksplan (kultur *starter*) yang digunakan pada penelitian ini adalah kalus embriogenik (KE) *D. Indonesia Raya 'Ina'* asal tunas pucuk plantlet ( $\pm 0.3$  mm) yang diinisiasi pada medium padat/semi solid IM-3 (medium  $\frac{1}{2}$  Murashige dan Skoog (Murashige dan Skoog 1962; MS) + 1.5 mg L<sup>-1</sup> 1-Phenyl-3-[1,2,3-thidiazol-5-yl] urea (TDZ) + 0.5 mg L<sup>-1</sup> N<sup>6</sup>-benzyl adenin (BA) + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa + 2 g L<sup>-1</sup> gelrite) dengan pH media 5.8 selama  $\pm 1$  bulan (Gambar 1A). Proliferasi awal KE dilakukan dengan menggunakan teknik *thin cross section* (TCS) KE primer/memotong melintang kalus (ketebalan 0.5-1.0 mm) dan mengkulturkannya dalam petridish ( $\varnothing$  6 cm) berisi 5 mL media IM-3 dengan penambahan 150 mL L<sup>-1</sup> air kelapa (AK) dan disubkultur 4 - 5 kali dengan interval 1 bulan. Proliferasi kalus selanjutnya dilakukan dalam erlenmeyer 100 ml berisi 25 ml media cair PM-12 (medium  $\frac{1}{2}$  MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0.10 mg L<sup>-1</sup> BA + 150 mL L<sup>-1</sup> AK) dengan kepadatan kalus 3 g dan kultur digojok di atas *orbital shaker* dengan kecepatan  $\pm 100$  rpm, disubkultur 3-4 kali dengan interval 1 bulan (Gambar 1B). Semua tahapan kultur diinkubasi pada kondisi terang 12 jam di bawah lampu fluorescent dengan intensitas cahaya 13  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pada  $23.5 \pm 1.1$  °C (Rachmawati *et al.*, 2015). Kalus yang tumbuh dan berproliferasi dengan baik digunakan sebagai kultur *starter* untuk optimasi perbanyakan masal KE menggunakan bioreaktor.

*Proliferasi Kalus Embriogenik (KE) D. Indonesia Raya 'Ina' dalam Airlift Bioreactor 500 mL dengan Tingkat Aerasi dan Kepadatan Kalus yang Berbeda*

Kultur *starter* yang digunakan adalah KE asal tunas pucuk *D. Indonesia Raya 'Ina'* pada fase awal pertumbuhan cepat (umur  $\pm 8$  bulan). Percobaan menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) faktorial dua faktor. Faktor pertama adalah empat taraf kepadatan kalus (5, 10, 15, dan 20 g kalus dalam 250 mL media) dan faktor kedua

adalah tiga tingkat aerasi [2.5, 5.0, dan 10.0 vvm (volume  $O_2$  per volume media per menit)]. Setiap perlakuan diulang 3 kali, sehingga terdapat 36 satuan percobaan. Kalus dikulturkan pada media Bio-3 ( $1/2$  MS +  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $150 \text{ mg L}^{-1}$  L-prolin +  $150 \text{ mL L}^{-1}$  AK +  $20 \text{ g L}^{-1}$  sukrosa) dengan pH media 5.8 dan diinkubasi pada kondisi lingkungan seperti tahap sebelumnya. Subkultur dilakukan setiap bulan hingga laju proliferasi kalus mencapai fase stasioner dan siap untuk dikecambahkan. Peubah yang diamati adalah: (1) bobot basah kalus (g), (2) penambahan bobot basah kalus (%), (3) tingkat multiplikasi, (4) bobot kering kalus (g), (5) perkembangan sel kalus [kalus embriogenik (KE); embrio somatik (ES); kecambah (Kc)] (%), dan (6) malformasi morfologi kalus (coklat, masif, dan hiperhidrik) (%).

#### *Diferensiasi dan Perkecambahan Embrio Somatik (ES) D. Indonesia Raya 'Ina' pada Media yang Berbeda*

Kalus yang dipanen dari bioreaktor dibilas dengan aquadest steril dan ditempatkan di atas kertas tissue steril dalam cawan petri, kemudian disimpan selama 3-7 hari pada suhu  $18 \pm 2^\circ \text{C}$  (Rachmawati *et al.*, 2015). Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan delapan perlakuan media perkecambahan (MK), yaitu dua media dasar ( $1/2$  MS dan  $2 \text{ g L}^{-1}$  pupuk majemuk NPK dengan perbandingan 32:10:10) dikombinasikan dengan empat perlakuan (tanpa zat pengatur tumbuh (zpt),  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  BA,  $150 \text{ mL L}^{-1}$  AK, dan kombinasi keduanya) dengan penambahan  $20 \text{ g L}^{-1}$  gula dan  $7 \text{ g L}^{-1}$  agar. Setiap perlakuan terdiri dari  $\pm 15$  gerombol kalus ( $\varnothing \pm 0.5 \text{ cm}$ ) yang dikulturkan dalam satu petridish ( $\varnothing 9 \text{ cm}$ ) dan diulang tiga kali, sehingga terdapat 360 satuan percobaan. Kultur diinkubasi pada kondisi lingkungan seperti tahap sebelumnya selama  $\pm 2$  bulan. Peubah yang diamati adalah: (1) waktu inisiasi ES (hari), (2) pembentukan ES (%), (3) jumlah ES per gerombol, (4) waktu perkecambahan ES (hari), (5) perkecambahan ES (%), (6) jumlah kecambah per gerombol, dan (7) malformasi morfologi kecambah (%).

#### *Produksi Plantlet D. Indonesia Raya 'Ina' Asal Media Perkecambahan yang Berbeda*

Kecambah dengan 2-3 daun dan tinggi  $\pm 1 \text{ cm}$  dari delapan media perkecambahan masing-masing disubkultur ke media AM-5 ( $2 \text{ g L}^{-1}$  Hyponex® (20N-20P-20K-TE) +  $150 \text{ mL L}^{-1}$  AK +  $20 \text{ g L}^{-1}$  gula +  $7 \text{ g L}^{-1}$  agar + 2% arang aktif) untuk pembesaran plantlet (Rachmawati *et al.*, 2015). Percobaan menggunakan RAL dengan tiga ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 10 plantlet yang dikulturkan dalam botol jam ( $\varnothing 7 \text{ cm}$ ; tinggi  $12 \text{ cm}$ ), sehingga terdapat 240 satuan percobaan. Kultur diinkubasi pada kondisi lingkungan seperti tahap sebelumnya selama  $\pm 3$  bulan. Peubah yang diamati adalah: (1) tinggi plantlet (cm), (2) jumlah daun per plantlet, (3) panjang daun (cm), (4) lebar daun (cm), (5) jumlah akar, (6) panjang akar (cm), (7) bobot basah plantlet (g), dan (8) bobot kering plantlet (g).

#### *Aklimatisasi Plantlet D. Indonesia Raya 'Ina' di Rumah Kaca*

Plantlet umur  $\pm 3$  bulan (perakaran baik, 3-5 daun, dan tinggi 4-5 cm) dipersiapkan untuk aklimatisasi dengan disimpan selama 4 minggu di luar ruang inkubasi (*hardening*). Plantlet dicuci dan direndam dalam 2% larutan fungisida dan bakterisida ( $\pm 5$  menit) dan dikeringanginkan. Sebanyak 500 plantlet selanjutnya ditanam pada 5 tray plastik ( $29 \text{ cm} \times 23 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$ ) berisi media pakis dan ditempatkan di rumah kaca. Setelah satu minggu, plantlet disiram setiap pagi dan dipupuk 2 kali seminggu dengan  $1 \text{ g L}^{-1}$  pupuk daun dengan NPK seimbang (20:20:20). Dua bulan kemudian bibit ditanam secara individu pada pot ( $\varnothing 15 \text{ cm}$ ) berisi arang kayu dan pakis (1:1, v/v). Plantlet hidup dan pertumbuhan bibit dicatat 2 bulan setelah aklimatisasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### *Proliferasi Kalus Embriogenik (KE) D. Indonesia Raya 'Ina' dalam Airlift Bioreactor 500 mL dengan Tingkat Aerasi dan Kepadatan Kalus yang Berbeda*

Tingkat aerasi, kepadatan kalus, dan interaksi keduanya berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan proliferasi KE *D. Indonesia Raya 'Ina'* dalam *airlift bioreactor* 500 mL (Tabel 1, Gambar 1C, 1D). Pertumbuhan dan proliferasi KE paling optimal terdapat pada kombinasi 2.5 vvm/10 g kalus dengan 68.48 g bobot basah kalus, 584.8% penambahan bobot basah kalus, 6.85 tingkat multiplikasi dan 3.41 g bobot kering kalus. Kombinasi berikutnya yang berdasarkan uji statistik tidak berbeda nyata dengan kombinasi sebelumnya adalah 2.5 vvm/10 g dan 5 vvm/15 g. Proliferasi KE terendah ditemukan pada kombinasi 10 vvm/5 g dan 5 vvm/20 g. Kalus pada kedua kombinasi perlakuan tersebut mengalami pencoklatan dan akhirnya mati, akibat dari gesekan dan pengendapan kalus.

Pertumbuhan dan perkembangan kalus yang diamati secara berkala juga berhasil diketahui bahwa perlakuan kepadatan kalus juga berpengaruh besar terhadap proporsi kondisi kalus. Pada kepadatan kalus 5, 10 dan 15 g per 250 mL, KE mampu dipertahankan pada persentase tinggi (98.0, 94.0, dan 91.2%), namun pada kepadatan kalus 5 g KE umumnya mengalami pencoklatan. Kultur KE dalam bioreaktor juga menyebabkan terjadinya konversi KE menjadi ES, ES menjadi plantlet (perkecambahan ES) dan pencoklatan KE. Konversi KE menjadi ES, perkecambahan ES dan pencoklatan tertinggi ditemukan pada kepadatan KE 20 g/250 mL media yang mencapai 14.3%, 6.0% dan 52.3% secara berurutan (Tabel 2). Selanjutnya perkembangan sel terbaik ditemukan pada tingkat aerasi 5 vvm dengan persentase KE yang tinggi (94.5%) dan persentase ES (4.1%), kecambah (1.4%) dan pencoklatan kultur yang rendah. Pada 10 vvm persentase KE tinggi, namun kalus mengalami pencoklatan. Diferensiasi dari KE menjadi ES dan kecambah yang tinggi terjadi pada 2.5 vvm (Tabel 3).

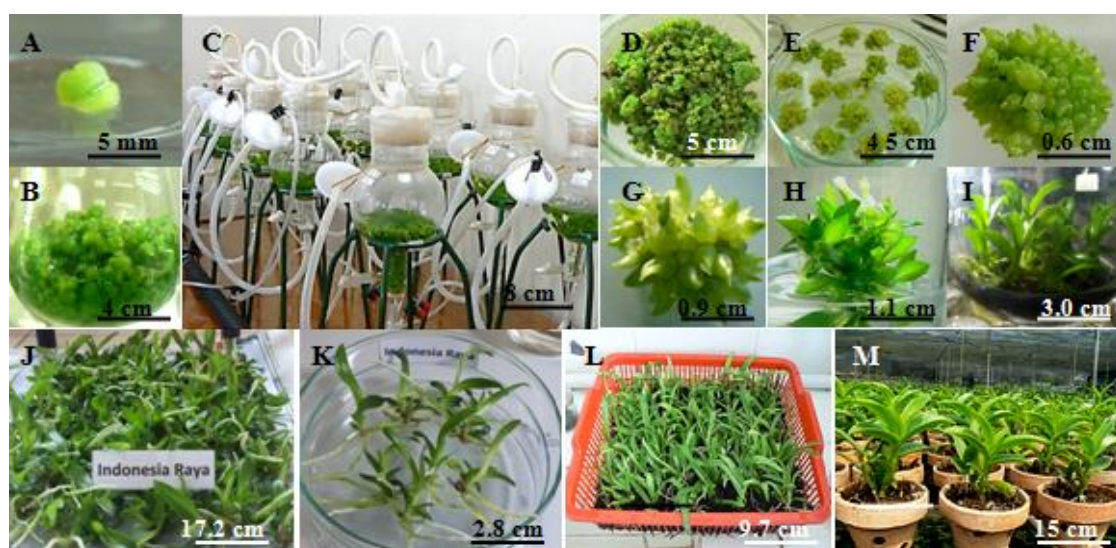
Tabel 1. Pengaruh kepadatan kalus dan tingkat aerasi terhadap proliferasi kalus embriogenik *D. Indonesia Raya* 'Ina' dalam *airlift bioreactor* 500 mL

| Tingkat aerasi (vvm) | Kepadatan kalus (g kalus dalam 250 mL media) |        |        |        |                                   |        |         |         |
|----------------------|--|--------|--------|--------|-----------------------------------|--------|---------|---------|
|                      | Bobot basah kalus (g)                        |        |        |        | Pertambahan bobot basah kalus (%) |        |         |         |
|                      | 5  | 10     | 15     | 20     | 5                                 | 10     | 15      | 20      |
| 2.5                  | 15.13ab                                      | 68.48a | 69.80c | 55.30c | 202.6ab                           | 584.8a | 365.3b  | 176.5b  |
| 5                    | 17.89a                                       | 66.72a | 85.04a | 62.54b | 257.8a                            | 567.2a | 466.9a  | 212.7ab |
| 10                   | 12.63b                                       | 52.22b | 75.54b | 73.04a | 152.6b                            | 422.2b | 403.6ab | 265.2a  |
| KK (%)               | 11.76  | 10.25  | 8.18   | 7.9    | 10.68                             | 10.64  | 8.62    | 9.77    |
|                      | Tingkat multiplikasi                         |        |        |        | Bobot kering kalus (g)            |        |         |         |
|                      | 5  | 10     | 15     | 20     | 5                                 | 10     | 15      | 20      |
|                      | 5  | 10     | 15     | 20     | 5                                 | 10     | 15      | 20      |
| 2.5                  | 3.03ab                                       | 6.85a  | 4.65b  | 2.77b  | 1.86a                             | 3.41a  | 2.58b   | 1.78b   |
| 5                    | 3.58a  | 6.67a  | 5.67a  | 3.13ab | 1.98a                             | 3.30a  | 3.08a   | 1.17a   |
| 10                   | 2.53b  | 5.22b  | 5.04ab | 3.65a  | 1.48b                             | 2.92b  | 2.96a   | 1.28a   |
| KK (%)               | 9.68   | 10.16  | 7.62   | 5.77   | 9.11                              | 10.64  | 7.62    | 7.79    |

Keterangan: Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama untuk masing-masing peubah tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Tukey pada taraf 5%

Hasil pengamatan dan pengambilan data secara berkala menunjukkan bahwa kultur KE dalam *airlift bioreactor* untuk tujuan perbanyakan juga menimbulkan pertumbuhan dan perkembangan yang menyimpang (malformasi). Persentase malformasi pada kultur KE dalam *airlift bioreactor* berkisar antara 6.1 s/d 64.0%. Persentase malformasi rendah (6.1%) terdapat pada kombinasi aerasi 2.5 vvm dengan 10 g kepadatan KE, sementara malformasi tertinggi (64.0%) terdapat pada kombinasi 2.5 vvm dengan 20 g kepadatan KE (Gambar 2). Hal yang menarik dan dicatat pada penelitian ini adalah kepadatan KE baik 5 g maupun 20 g yang diberi aerasi rendah maupun tinggi menyebabkan

terjadinya persentase malformasi yang tinggi. Perlakuan seimbang yang menghasilkan KE tinggi 90-94% dengan malformasi yang rendah 6-10% ditemukan pada kombinasi aerasi 2.5 vvm dan 5 vvm dengan 10 g kepadatan KE dan malformasi tersebut berupa 3.5-6.0% pencoklatan, 1.5-2.0% kalus yang massif dan 1.3-2.1% kalus hiperhidrisiti (Gambar 3). Malformasi terjadi sebagai akibat pergerakan aktif KE yang disebabkan oleh masuknya gelembung udara ke dalam media (aerasi media), kondisi kultur yang terendam terus menerus dan keseimbangan kebutuhan hara dan faktor lingkungan yang mudah berubah.



Gambar 1. Tahapan perbanyakan benih *D. Indonesia Raya* 'Ina' melalui embriogenesis somatik berbasis sistem bioreaktor. (A) Induksi dan pembesaran KE ( $\pm$  1 bulan); (B) Proliferasi KE/ kultur starter (2-7 bulan); (C) Proliferasi KE dalam *airlift bioreactor* 500 mL ( $\pm$  3 bulan); (D) KE dipanen dan siap untuk dikecambahkan; (E-F) Diferensiasi KE-ES; (G) Kecambah ES; (H) Kecambah; (I) Produksi plantlet (3 bulan); (J-K) Plantlet siap aklimatisasi; (L) Kompotan plantlet; (M) Bibit umur 4 bulan

Tabel 2. Pengaruh kepadatan kalus terhadap perkembangan sel kalus *D. Indonesia Raya 'Ina'* dalam *airlift bioreactor* 500 mL

| Kepadatan kalus<br>[g (250 mL) <sup>-1</sup> ] | Perkembangan sel kalus |        |              | Kondisi kultur |
|--|------------------------|--------|--------------|----------------|
|  | KE (%)                 | ES (%) | Kecambah (%) |                |
| 5  | 98.0a                  | 1.5b   | 0.5b         | Coklat         |
| 10   | 98.3a                  | 2.5b   | 0.2b         | Hijau          |
| 15   | 94.2a                  | 3.5b   | 2.3b         | Hijau          |
| 20   | 79.7b                  | 14.3a  | 6.0a         | Coklat         |
| KK (%)   | 12.03                  | 16.72  | 15.25        |                |

Keterangan: KE = kalus embriogenik; ES = embrio somatik. Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Tukey pada taraf 5%

Tabel 3. Pengaruh tingkat aerasi terhadap perkembangan sel kalus *D. Indonesia Raya 'Ina'* dalam *airlift bioreactor* 500 mL

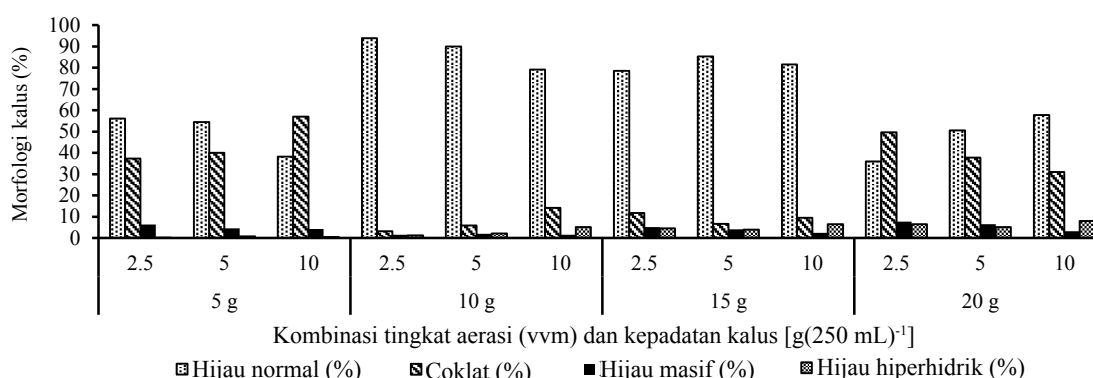
| Tingkat aerasi<br>(vvm) | Perkembangan sel kalus |        |              | Kondisi kultur |
|-------------------------|------------------------|--------|--------------|----------------|
|                         | KE (%)                 | ES (%) | Kecambah (%) |                |
| 2.5                     | 86.6b                  | 7.8a   | 5.6a         | Hijau          |
| 5                       | 94.5a                  | 4.1b   | 1.4b         | Hijau          |
| 10                      | 97.8a                  | 1.5b   | 0.7b         | Coklat         |
| KK (%)                  | 10.56                  | 13.05  | 16.77        |                |

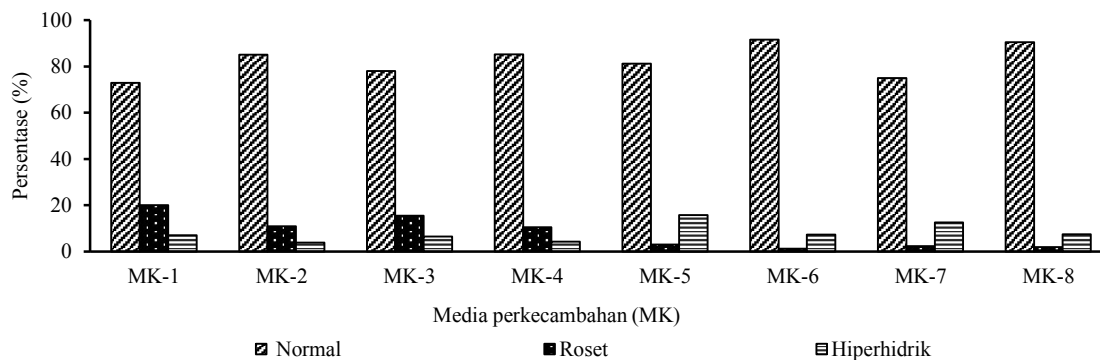
Keterangan: KE = kalus embriogenik; ES = embrio somatik. Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Tukey pada taraf 5%

#### Diferensiasi dan Perkecambahan Embrio Somatik (ES) *D. Indonesia Raya 'Ina'* pada Media yang Berbeda

Variasi media yang diujicobakan dalam penelitian ini memberikan pengaruh nyata terhadap diferensiasi dan perkecambahan ES *D. Indonesia Raya 'Ina'* hasil perbanyakan menggunakan *airlift bioreactor*. Diferensiasi dan perkecambahan ES terbaik ditemukan pada media semi solid MK-2 (1/2 MS + 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA) dengan waktu inisiasi ES tercepat (15.3 hari), 87.66% pembentukan ES, dan 44.5 ES per gerombol, serta 19.44 hari inisiasi perkecambahan ES dengan 92.08% ES berkecambah dan 41.0 kecambah ES per gerombol. Media terbaik berikutnya

yang secara uji statistik tidak berbeda nyata dengan MK-2 adalah MK-6 [(2 g L<sup>-1</sup> NPK (32:10:10) + 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA)], MK-4 [(1/2 MS + 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA + 150 mL L<sup>-1</sup> AK)] dan MK-8 [(2 g L<sup>-1</sup> NPK (32:10:10) + 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA + 150 mL L<sup>-1</sup> AK)]. Diferensiasi dan perkecambahan ES terendah ditemukan pada MK-1 dan MK-5 [(1/2 MS dan 2 g L<sup>-1</sup> NPK (32:10:10) tanpa BA)] (Tabel 4; Gambar 1E-H). Media MK-6 menghasilkan persentase kecambah normal (tinggi ≥ 1 cm; 2-3 daun) tertinggi (91.5%) dengan 8.5% kecambah abnormal (1.2% roset dan 7.3% hiperhidrik). Persentase kecambah normal yang tinggi juga terdapat pada MK-8, MK-4, dan MK-2 dan secara statistik tidak berbeda nyata dengan MK-6 (Gambar 3).

Gambar 2. Pengaruh kepadatan kalus dan tingkat aerasi terhadap malformasi morfologi kalus *D. Indonesia Raya 'Ina'* dalam *airlift bioreactor* 500 mL



Gambar 3. Pengaruh media terhadap persentase kecambah normal dan abnormal *D. Indonesia Raya 'Ina'* asal proliferasi kalus menggunakan airlift bioreactor 500 mL

#### Produksi Plantlet *D. Indonesia Raya 'Ina'* Asal Media Perkecambahan yang berbeda

Produksi pertumbuhan plantlet diperlukan untuk mempersiapkan plantlet yang siap diaklimatisasi. Asal media perkecambahan berpengaruh nyata terhadap kecepatan pertumbuhan plantlet menjadi plantlet. Plantlet asal media perkecambahan MK-2 dan MK-6 memperlihatkan pertumbuhan yang lebih cepat dengan kualitas plantlet yang lebih baik. Plantlet asal media MK-2 memiliki nilai rerata tertinggi pada peubah jumlah daun (5.7 daun per plantlet), lebar daun (1.62 cm), bobot basah plantlet (0.387 g), dan bobot kering plantlet (0.026 g). Tinggi plantlet (3.82 cm) dan panjang daun (4.05 cm) tertinggi dengan jumlah akar terbanyak (5.6) ditunjukkan oleh plantlet asal media MK-6. Pertumbuhan plantlet terbaik berikutnya diperlihatkan oleh plantlet asal media MK-4 dan MK-8 (Tabel 5; Gambar 11-K). Plantlet asal media dasar ½ MS terlihat lebih hijau dan vigor dengan jumlah daun lebih banyak (4.8-5.7), daun lebih lebar (1.33-1.56 cm), akar lebih panjang (2.40-3.14

cm), bobot basah dan bobot kering plantlet lebih tinggi. Plantlet asal media dasar 2 g L<sup>-1</sup> pupuk daun dengan NPK (20:20:20) umumnya lebih tinggi dengan ukuran daun lebih panjang (3.25 - 4.05 cm), jumlah akar lebih banyak (4.3-5.6 akar per plantlet), dan berwarna hijau muda.

#### Aklimatisasi Plantlet *D. Indonesia Raya 'Ina'* di Rumah Kaca

Aklimatisasi plantlet asal media MK-2 dan MK-6 yang dikultur pada media pembesaran AM-5 berhasil diaklimatisasi secara kompotan pada media *Cycas rumpii* dengan tingkat keberhasilan hidup yang tinggi (91.6%) (Gambar 1L). Dua bulan setelah aklimatisasi diperoleh bibit yang siap untuk ditanam secara individu pada pot berisi media arang kayu dan *C. rumpii* (1:1, v/v). Setelah 4 bulan diperoleh bibit yang seragam, sehat dan vigor (Gambar 1M).

Secara keseluruhan rangkaian penelitian ini berhasil mendapatkan metode proliferasi KE *D. Indonesia Raya*

Tabel 4. Diferensiasi dan perkecambahan embrio somatik (ES) *D. Indonesia Raya 'Ina'* pada media yang berbeda

| Media  | Waktu inisiasi pembentukan ES (Hari) | Pembentukan ES (%) | Jumlah ES per gerombol kalus | Waktu inisiasi kecambah (hari) | Pembentukan kecambah (%) | Jumlah kecambah per gerombol kalus |
|--------|--------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| (MK)   |                                      |                    |                              |                                |                          |                                    |
| MK-1   | 25.3ab                               | 69.7bc             | 26.4bc                       | 31.7ab                         | 80.0b                    | 21.1bc                             |
| MK-2   | 15.3c                                | 87.7a              | 44.5a                        | 19.4d                          | 92.1a                    | 41.0a                              |
| MK-3   | 22.2b                                | 78.5ab             | 30.8b                        | 30.7b                          | 77.6b                    | 23.9b                              |
| MK-4   | 16.6c                                | 80.3a              | 37.8a                        | 22.3c                          | 90.3a                    | 34.1a                              |
| MK-5   | 30.0a                                | 64.7c              | 17.8c                        | 36.6a                          | 68.5c                    | 12.2d                              |
| MK-6   | 18.6bc                               | 82.7a              | 39.1a                        | 25.5c                          | 86.9ab                   | 34.0a                              |
| MK-7   | 27.0a                                | 71.3b              | 23.3c                        | 32.3ab                         | 66.7c                    | 15.6cd                             |
| MK-8   | 17.0c                                | 80.3a              | 34.8b                        | 28.0bc                         | 81.4b                    | 28.6b                              |
| KK (%) | 11.56                                | 10.55              | 14.66                        | 9.87                           | 7.55                     | 13.25                              |

Keterangan: MK-1 s/d MK-4 [1/2 MS dikombinasikan dengan (tanpa zpt, 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA, 150 ml L<sup>-1</sup> air kelapa, dan kombinasi keduanya)] dan MK-5 s/d MK-8 [2 g L<sup>-1</sup> NPK (32:10:10) dikombinasikan dengan (tanpa zpt, 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA, 150 mL L<sup>-1</sup> air kelapa, dan kombinasi keduanya)] dengan penambahan 20 g L<sup>-1</sup> gula dan 7 g L<sup>-1</sup> agar. Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Tukey pada taraf 5%.



Tabel 5. Produksi plantlet *D. Indonesia Raya* 'Ina' asal media perkecambahan (MK) yang berbeda

| Asal Media (MK) | Tinggi plantlet (cm) | Jumlah daun per plantlet | Panjang daun (cm) | Lebar daun (cm) | Jumlah akar | Panjang akar (cm) | Bobot basah plantlet (g) | Bobot kering plantlet (g) |
|-----------------|----------------------|--------------------------|-------------------|-----------------|-------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| MK-1            | 2.87c                | 5.6a                     | 2.55c             | 1.49b           | 3.0d        | 2.40b             | 0.250c                   | 0.013c                    |
| MK-2            | 3.44ab               | 5.7a                     | 3.16b             | 1.56a           | 4.7b        | 2.76a             | 0.387a                   | 0.026a                    |
| MK-3            | 2.92bc               | 5.2b                     | 2.72bc            | 1.33b           | 3.6c        | 2.64a             | 0.265bc                  | 0.015c                    |
| MK-4            | 3.16b                | 4.8b                     | 2.98bc            | 1.62a           | 2.9d        | 3.14a             | 0.375a                   | 0.020b                    |
| MK-5            | 3.04b                | 4.3c                     | 3.32b             | 1.12c           | 4.3c        | 1.77c             | 0.253c                   | 0.014c                    |
| MK-6            | 3.82a                | 4.8b                     | 4.05a             | 1.45b           | 5.6a        | 2.47b             | 0.335b                   | 0.018b                    |
| MK-7            | 3.20b                | 4.3c                     | 3.25b             | 1.25b           | 4.5c        | 2.24b             | 0.245c                   | 0.013c                    |
| MK-8            | 3.54a                | 4.6b                     | 3.84a             | 1.47b           | 5.3b        | 2.72a             | 0.349ab                  | 0.019b                    |
| KK (%)          | 7.85                 | 9.22                     | 11.23             | 13.66           | 9.45        | 10.33             | 8.56                     | 10.44                     |

Keterangan: MK-1 s/d MK-4 [1/2 MS dikombinasikan dengan (tanpa zpt, 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA, 150 mL L<sup>-1</sup> air kelapa, dan kombinasi keduanya)] dan MK-5 s/d MK-8 [2 g L<sup>-1</sup> NPK (32:10:10) dikombinasikan dengan (tanpa zpt, 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA, 150 mL L<sup>-1</sup> air kelapa, dan kombinasi keduanya)] dengan penambahan 20 g L<sup>-1</sup> gula dan 7 g L<sup>-1</sup> agar. Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Tukey pada taraf 5%

'Ina' skala masal menggunakan *airlift bioreactor* 500 mL dan metode regenerasi (diferensiasi, perkecambahan, dan pembesaran plantlet) yang teroptimasi. Penelitian ini mengungkapkan secara jelas bahwa pertumbuhan dan proliferasi KE dalam *airlift bioreactor* sangat dipengaruhi oleh tingkat aerasi dan kepadatan kalus. Selain itu terbukti bahwa produksi benih berkualitas *D. Indonesia Raya* 'Ina' sangat ditentukan oleh keberhasilan meregenerasikan KE, mengecambahkan ES, dan menyiapkan plantlet berkualitas yang siap untuk diaklimatisasi.

Kesesuaian tingkat aerasi dan kepadatan kalus yang digunakan sangat mempengaruhi keberhasilan proliferasi dan pertumbuhan KE dalam bioreaktor. Menurut Ziv (2005) kombinasi tingkat aerasi dan kepadatan kalus sangat berpengaruh terhadap agitasi, sirkulasi udara dan jumlah O<sub>2</sub> terlarut yang akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan dalam bioreaktor. Winarto *et al.* (2013) menemukan kepadatan eksplan 15 g L<sup>-1</sup> dengan tingkat aerasi 5 vvm atau 10 g L<sup>-1</sup> dengan 10 vvm mampu meningkatkan kecepatan proliferasi plbs *D. 'Zahra FR-62'* dengan penampilan plbs yang hijau tua, segar dan remah. Keberhasilan aplikasi bioreaktor dalam perbanyakan plbs juga dilaporkan pada *Phalaenopsis* pada kepadatan kalus 20 g L<sup>-1</sup> dan tingkat aerasi 2 vvm (Young *et al.*, 2000) dan *Oncidium* 'Sugar Sweet' pada kepadatan kalus 20 g L<sup>-1</sup> (Yang *et al.*, 2010). Pada penelitian ini kombinasi tingkat aerasi dan kepadatan kalus memberikan respon yang berbeda/bervariasi. Proliferasi KE teroptimal ditemukan pada tingkat aerasi 2.5 vvm yang dikombinasikan dengan kepadatan kalus 10 g dalam 250 mL media cair Bio-3 (1/2 MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg L<sup>-1</sup> BA + 150 mg L<sup>-1</sup> L-prolin + 150 mL L<sup>-1</sup> AK + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa). Keseimbangan antara kedua faktor tersebut akan menghasilkan rasio proliferasi yang tinggi dan benih yang berkualitas.

Pencampuran kalus dan media yang terjadi secara terus-menerus dan ketidakseimbangan antara tingkat

aerasi dan kepadatan kalus dapat menyebabkan munculnya cekaman lingkungan yang berakibat pada penurunan laju pertumbuhan, penyimpangan/malformasi morfogenesis dan kematian sel. Masalah yang sering muncul adalah pencoklatan kalus, vitrifikasi (hiperhidrisiti), terbentuknya agregat sel (kalus kompak), terbentuknya busa, penurunan laju pertumbuhan dan kematian sel (Ziv, 2005; Esyanti dan Muspiah, 2006; Celiktas *et al.*, 2010). Penyumbang terbesar terjadinya malformasi pada penelitian ini adalah pencoklatan kalus (30.98-57.03%). Pencoklatan kalus terjadi akibat stres jaringan kalus karena gesekan dan pengendapan kalus sebagai akibat dari ketidakseimbangan antara tingkat aerasi dan kepadatan kalus yang digunakan. Pelukaan akibat gesekan antar kalus menyebabkan pecahnya vakuola dan merangsang munculnya senyawa fenol yang akan segera bereaksi dengan oksigen dan enzim fenol oksidase membentuk senyawa kuinon yang bersifat racun dan menyebabkan kematian sel (Pirttila *et al.*, 2008; Rittirat *et al.*, 2012).

Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dalam kultur *in vitro* sangat dipengaruhi oleh media kultur yang digunakan (George *et al.*, 2007; Rianawati *et al.*, 2009). Media yang digunakan menjadi faktor penentu dan bersifat spesifik terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro*, terkait dengan kecepatan pertumbuhan, pemanjangan dan kualitas morfogenesisnya (Niedz dan Evans, 2007). Diferensiasi dan perkecambahan ES beberapa kultivar *Dendrobium* dilakukan pada media tanpa maupun dengan penambahan zpt tertentu (Chung *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Khasrovi *et al.*, 2008; Winarto *et al.*, 2013; Rachmawati *et al.*, 2014). Hasil penelitian ini menginformasikan bahwa kemampuan regenerasi KE menjadi ES *D. Indonesia Raya* 'Ina' terbaik ditemukan pada media padat 1/2 MS dengan penambahan 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA dengan dan/atau tanpa 150 mL L<sup>-1</sup> AK (MK-2 dan MK-4), sedangkan untuk tahap pertumbuhan selanjutnya yaitu

regenerasi ES menjadi kecambah teroptimasi ditemukan pada media  $\frac{1}{2}$  MS dengan penambahan 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA tanpa 150 mL L<sup>-1</sup> AK (MK-2). Hasil ini membuktikan bahwa untuk mendapatkan kemampuan regenerasi (regenerasi dan perkecambahan) ES *D. Indonesia* Raya 'Ina' yang optimal masih diperlukan ketersediaan hara yang cukup tinggi/memadai dan kehadiran zpt meskipun dalam konsentrasi sangat rendah. Hasil serupa diperoleh pada regenerasi ES *D. 'Zahra FR-62'* (Winarto *et al.*, 2013) dan *D. 'Gradita 10'* (Rachmawati *et al.*, 2014).

## KESIMPULAN

Metode proliferasi kalus embriogenik *D. Indonesia* Raya 'Ina' menggunakan *airlift bioreactor* 500 mL dan kemampuan regenerasinya (diferensiasi, perkecambahan, dan produksi plantlet) berhasil dikembangkan dengan memperhatikan faktor tingkat aerasi, kepadatan kalus, dan media. Proliferasi kalus embriogenik paling optimal di dalam *airlift bioreactor* 500 mL ditemukan pada kombinasi tingkat aerasi 2.5 vvm dengan kepadatan kalus 10 g. Media semi solid  $\frac{1}{2}$  MS + 0.05 mg L<sup>-1</sup> BA merupakan media terbaik untuk diferensiasi dan perkecambahan embrio somatik dengan pertumbuhan plantlet terbaik. Plantlet berhasil diaklimatisasi dengan keberhasilan tumbuh yang tinggi (91.6% plantlet hidup) dan menghasilkan bibit yang seragam, sehat, dan vigor.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto, D., M.N. Normah, R. Ibrahim, A. Mohamad. 2012. Efficient somatic embryo production of limau madu (*Citrus suhuiensis* Hort. Ex. Tanaxa) in liquid culture. *Afr. J. Biotech.* 11:2879-2888.
- Aragón, C.E., M. Escalona, R. Rodriguez, M.J. Cañal, I. Capote, D. Pina, J.G. Olmedo. 2010. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 46:9-94.
- Celiktas, O.Y., A. Gurel, F.V. Sukan. 2010. Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors. Transworld Res Network, India.
- Chung, H.H., J.T. Chen, W.C. Chang. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biol. Plantarum* 51:346-350.
- Debnath, S.C. 2009. Characteristics of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) plants propagated by in vitro bioreactor culture and *ex vitro* propagation method. *Eng. Life Sci.* 9:239-246.
- Dewir, Y.H., D. Chakrabarty, E.J. Hahn, K.Y. Paek. 2006. A simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactors. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 42:291-297.
- Dewir, Y.H., N. Singh, S. Govender, P. Pillay. 2010. *In vitro* flowering and shoot multiplication of *Gentiana triflora* in air-lift bioreactor cultures. *J. Appl. Hort.* 12:30-34.
- Ducos, J.P., C. Lambot, V. Pétiard. 2007. Bioreactors for coffee by somatic embryogenesis. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1:1-12.
- Esyanti, R.R., A. Muspiah. 2006. Pola produksi Ajmalisin dari kultur agregat sel *Chataranthus roseus* (L.) dalam bioreaktor *airlift*. *Hayati* 13:161-165.
- Etienne, H., E. Dechamp, D.B. Etienne, B. Bertrand. 2006. Bioreactors in coffee micropropagation. *Braz. J. Plant Physiol.* 18:45-54.
- George, E.F., M.A. Hall, G.J. De Klerk. 2007. *Plant Propagation by In Vitro Culture*, 3rd edition: Volume 1, The Background, Exegetic, Basingstone, UK.
- Khasrovi, A.R., M.A. Kadir, S.B. Kazemin, F.Q. Zaman, A.E. De Silva. 2008. Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium* cv Serdang Beauty. *Afr. J. Biotech.* 7:4093-4099.
- Kuehnle, A.R. 2007. Orchids: *Dendrobium*. p. 539-560. In N.O. Anderson (Ed.). *Flower Breeding and Genetics*. Springer, The Netherlands.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Niedz, R.P., T.J. Evans. 2007. Regulating plant *in vitro* growth by mineral nutrition. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 43:370-381.
- Pirttilä, A.M., O. Podolich, J.J. Koskimäki, E. Hohtola, A. Hohtola. 2008. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 95:47-55.
- [PPVT] Pusat Perlindungan Varietas Tanaman. 2009. Deskripsi Anggrek *Dendrobium* Indonesia Raya 'Ina'. Lampiran Sertifikat Pendaftaran Varietas Hasil Pemuliaan Nomor 161/PVHP/2009. <http://setjen.deptan.go.id/ppvt> [22 Juni 2009].
- Rachmawati, F., A. Purwito, N.M.A. Wiendi, N.A. Mattjik, B. Winarto. 2014. Perbanyakan masal anggrek *Dendrobium* 'Gradita 10' secara *in vitro* melalui embriogenesis somatik. *J. Hort.* 24:196-209.



- Rachmawati, F., B. Winarto, N.M.A. Wiendi, N.A. Mattjik, A. Purwito. 2015. Shoot tips derived-somatic embryogenesis in mass propagation of *Dendrobium* Indonesia Raya 'Ina'. Emir. J. Food Agric. 27:808-817.
- Rianawati, S., A. Purwito, B. Marwoto, R. Kurniati, Suryanah. 2009. Embriogenesis somatik dari eksplan daun anggrek *Phalaenopsis* sp. L. J. Agron. Indonesia 37:240-248.
- Rittirat, S., K. Thammasiri, S. Te-chato. 2012. Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rehb. f. J. Agric. Technol. 8:2075-2085.
- Shaik, S., Y.H. Dewir, N. Singh, A. Nicholas. 2010. Micropropagation and bioreaktor studies of the medicinally important plant lessertia (*Sutherlandia frutescens* L.). South African J. Bot. 76:180-186.
- Takayama, S., M. Akita. 2005. Practical aspects of bioreaktor application in mass propagation of plants. p. 61-78. In A.K. Hvoslef-Eide, W. Preil (Eds.). Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation. Springer, The Netherlands.
- Widiastoety, D., N. Solvia, M. Soedarjo. 2010. Potensi anggrek *Dendrobium* dalam meningkatkan variasi dan kualitas anggrek bunga potong. J. Litbang. Pertanian 29:101-106.
- Winarto, B., F. Rachmawati, A.S. Setyawati, J.A. Teixeira da Silva. 2013. Mass propagation of *Dendrobium* 'Zahra FR 62: A new hybrid used for cut flowers, using bioreaktor culture. Sci. Hort. 161:70-180.
- Winarto, B., F. Rachmawati. 2013. *In vitro* propagation protocol of *Dendrobium* 'Gradita 31' via protocorm like bodies. Tham. Inter. J. Sci. Tech. 18:54-68.
- Yang, J.F., X.C. Piao, D. Sun, M.L. Lian. 2010. Production of protocorm-like bodies with bioreaktor and regeneration *in vitro* of *Oncidium* 'Sugar Sweet'. Sci. Hort. 125:712-717.
- Young, P.S., H.N. Murthy, P.K. Yoeup. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreaktor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 63:7-72.
- Zhao, P., F. Wu, F.S. Feng, W.J. Wang. 2008. Protocorm-like body (PLBs) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. In Vitro Cell Dev. Biol. 44:178-185.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81:277-285.